

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal**

**Viviane Ferreira dos Anjos**

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES SSR (*Simple Sequence Repeats*) NA ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE MATRIZES DE *Pinus taeda* Linnaeus**

**Diamantina-MG**

**2018**

**Viviane Ferreira dos Anjos**

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES SSR (*Simple Sequence Repeats*) NA ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE MATRIZES DE *Pinus taeda* Linnaeus.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia

**Diamantina - MG**

**2018**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A599u      Anjos, Viviane Ferreira dos  
Utilização de marcadores SSR (simple sequence repeats) na análise da diversidade genética de matrizes de *Pinus taeda Linnaeus* / Viviane Ferreira Dos Anjos, 2018.  
38 p. : il.

Orientador: Marcelo Luiz de Laia

Dissertação (Mestrado Profissional – Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Dimantina, 2018.

1. Loblolly pine. 2. Marcadores microssatélites. 3. Pomar de sementes. 4. Melhoramento genético. 5. Florestas plantadas.  
I. Laia, Marcelo Luiz de. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 634.9**

VIVIANE FERREIRA DOS ANJOS

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES SSR (*Simple Sequence Repeats*) NA  
ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE MATRIZES DE *Pinus taeda*  
Linnaeus**

Dissertação apresentada ao  
MESTRADO EM CIÊNCIA  
FLORESTAL, nível de MESTRADO  
como parte dos requisitos para  
obtenção do título de MAGISTER  
SCIENTIAE EM CIÊNCIA  
FLORESTAL

Orientador (a): Prof. Dr. Marcelo Luiz  
De Laia

Data da aprovação : 21/09/2018



Prof.Dr. MARCELO LUIZ DE LAIA - UFVJM



Prof.Dr. JOSE SEBASTIAO CUNHA FERNANDES - UFVJM



Dr.ª AMANDA GONÇALVES GUIMARÃES - UFVJM

DIAMANTINA

**À minha Mãe Anália por todo amor e dedicação, ao meu Pai João (*in memorian*) pelo exemplo de honestidade, e aos meus irmãos e irmãs por me proporcionarem a oportunidade que eles não tiveram.**

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, que tantas coisas boas tem proporcionado a mim e a toda minha família;

À minha mãe Anália, por toda dedicação, paciência e amor. Ao meu pai João, pelo exemplo de honestidade. Aos meus irmãos e irmãs, minha eterna gratidão. Sem vocês nada disso seria possível;

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, e ao Programa de Pós Graduação em Ciência Florestal, pela oportunidade, e apoio financeiro durante o curso;

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado e por tornar possível a realização desta pesquisa;

À empresa GERDAU S/A, pela doação do material vegetal para realização desse estudo;

Ao professor Marcelo Luiz de Laia, não só por abrir as portas do seu laboratório, mas pelos valiosos ensinamentos, dedicação, confiança e paciência ao longo destes anos de trabalho. Sempre pronto a ajudar, me mostrou o melhor caminho e apoiou as minhas decisões.

À Ariadne Marques, por toda ajuda, carinho e amizade e aos demais colegas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal, por todo carinho e parceria. Desde os que já passaram pelo laboratório, aos que estão até hoje, por acreditar na minha capacidade, reconhecer minha dedicação, e ajudar no meu crescimento.

Aos amigos e colegas do dia a dia, que de uma forma ou de outra me incentivaram com palavras de apoio, torcida e bem querer.

## RESUMO

Após sua introdução em 1948, o cultivo de *Pinus taeda* L. ocorre nas regiões sul e sudeste do Brasil e tem por finalidade, basicamente, abastecer os setores de celulose de fibras longas, painéis reconstituídos, construção civil, indústria moveleira e servir como fonte de energia (lenha industrial). Diante da sua importância econômica, pesquisadores buscam ferramentas que auxiliem no aumento da qualidade e da produtividade dos plantios e com isso, passaram a fazer uso dos marcadores moleculares, a fim de obter informações a respeito principalmente da diversidade genética entre os indivíduos que compõem a população de seleção. Assim, com vistas a contribuir com o programa de melhoramento do *Pinus taeda*, utilizou-se marcadores moleculares microssatélites (SSR) para detectar a existência de polimorfismos entre 124 plantas de um pomar de sementes. Para o desenvolvimento do estudo, foi realizada a extração do DNA genômico total do material vegetal (acículas) das 124 plantas de *Pinus taeda*, que após esse processo, foram amplificadas por 5 pares de iniciadores microssatélites específicos para a espécie. Os produtos da PCR foram separados em gel de poliacrilamida não desnaturante a 6%, corado com nitrato de prata e analisados visualmente, e em gel de agarose a 3%, corado com Brometo de Etídeo. Os marcadores moleculares microssatélites utilizados permitiram analisar a diversidade genética das plantas de *Pinus taeda* avaliadas. As informações de diversidade obtidas poderão auxiliar no processo de melhoramento genético da espécie. A depender do objetivo do programa de melhoramento, a população e sua diversidade poderão ser manipuladas, mediante cruzamentos e seleções devidamente direcionados.

**Palavras-chave:** Loblolly Pine, Marcadores microssatélites, Pomar de sementes, Melhoramento genético, Florestas plantadas.

## ABSTRACT

After its introduction in 1948, the cultivation of *Pinus taeda* L. occurs in the southern and southeastern regions of Brazil and its main purpose is to supply the long fiber cellulose, reconstituted panels, civil construction, furniture industry and serve as sources of energy (industrial firewood). Due to their economic importance, researchers are looking for tools that help increase the quality and productivity of the plantations and, with this, they started to make use of molecular markers, in order to obtain information about mainly the genetic diversity among the individuals that compose the population of selection. Thus, in order to contribute to the *Pinus taeda* breeding program, microsatellite molecular markers (SSR) were used to detect the existence of polymorphisms among 124 plants of a seed orchard. For the development of the study, total genomic DNA was extracted from the plant material (needles) of the 124 plants of *Pinus taeda*, which were amplified by 5 pairs of microsatellite primers specific to the species. The PCR products were separated on a 6% non-denaturing polyacrylamide gel, stained with silver nitrate and visually analyzed, and on a 3% agarose gel stained with Ethidium Bromide. The microsatellite molecular markers used allowed to analyze the genetic diversity of the *Pinus taeda* plants evaluated. The diversity information obtained may help in the process of genetic improvement of the species. Depending on the objective of the breeding program, the population and its diversity can be manipulated through crossings and selections.

**Key words:** Loblolly Pine, Molecular markers, Seed orchard, Genetic improvement, Planted forests.



## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>11</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Gênero Pinus .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2. <i>Pinus taeda</i> Linnaeus .....</b>	<b>12</b>
<b>3.3. Melhoramento genético do <i>Pinus taeda</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>3.4. Diversidade genética em pinus.....</b>	<b>14</b>
<b>3.5. Marcadores Moleculares .....</b>	<b>16</b>
<b>3.6. Marcadores Microssatélites .....</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
<b>4.1. Material vegetal.....</b>	<b>19</b>
<b>4.2. Extração do DNA genômico total .....</b>	<b>19</b>
<b>4.3. Análise qualitativa e quantitativa do DNA.....</b>	<b>19</b>
<b>4.4. Amplificação dos Marcadores Microssátélites via PCR.....</b>	<b>20</b>
<b>4.5. Problemas metodológicos .....</b>	<b>21</b>
<b>4.6. Análises estatísticas.....</b>	<b>24</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>24</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>33</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>34</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O setor brasileiro de árvores plantadas é responsável por 91% de toda a madeira utilizada para fins industriais e por 6,2% do PIB Industrial no País. Abrange uma área de 7,84 milhões de hectares, em sua maioria, reflorestada com eucalipto e pinus (IBÁ, 2017).

Nas regiões de maior altitude e clima frio, as espécies de *Pinus* se sobressaem às de eucalipto, por apresentarem melhor adaptação. Com destaque para o *Pinus taeda* que, em função do rápido crescimento aliado ao baixo teor de resina, apresenta-se como matéria prima principal para a fabricação de celulose de fibra longa, em indústrias moveleiras e na construção civil.

O *Pinus taeda* foi inicialmente plantado para fins comerciais no Brasil, em 1966. Embora os primeiros plantios realizados sem controle da qualidade das sementes tenham resultado em povoamentos de baixo rendimento, a espécie demonstrou possuir grande potencial, devido ao seu vigor e à alta produção de biomassa lenhosa.

Assim, diante da importância econômica, após sua introdução, os melhoristas buscaram ferramentas para aumentar a qualidade dos plantios e consequentemente a produtividade, com ênfase nas características de interesse. Tais características, em níveis favoráveis, embora intrínsecas da espécie não são equitativas entre as diferentes fontes de propágulo, ou seja, a uniformidade dos plantios depende da seleção e progressão de indivíduos superiores.

No entanto, os ganhos obtidos com a seleção em programas de melhoramento clássico resultam de um processo extremamente moroso e oneroso. Diante desse entrave, os melhoristas associaram técnicas de biologia molecular ao processo convencional de melhoramento genético, e dentre outras ferramentas, os marcadores moleculares passaram a auxiliar os processos de seleção e análise da diversidade genética das populações.

As informações relacionados a divergência genética dos genitores auxiliam no processo de recombinação e obtenção de indivíduos superiores para as características desejadas. O que, possibilita a obtenção de maiores ganhos advindos dos processos de seleção e uma melhor alocação dos indivíduos nos pomares de sementes ou pomares clonais.

Assim, com vistas a contribuir com o Programa de Melhoramento do *Pinus taeda*, marcadores moleculares microssatélites foram utilizados para detectar o grau de po-

limorfismo existente entre 124 plantas de um pomar de sementes. E consequentemente, analisar sua diversidade genética. Os resultados obtidos contribuirão para maximização dos ganhos oriundos da seleção e dos cruzamentos.

## **2. OBJETIVO**

Verificar, mediante utilização de marcadores moleculares microssatélites (SSR – *Simple Sequence Repeats*), a diversidade genética entre plantas de *Pinus taeda* L com o intuito de auxiliar no melhoramento genético da população.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1. Gênero Pinus**

Pertencente ao grupo das Gymnospermas, o gênero *Pinus* é o maior dentre as coníferas, com mais de 100 espécies já descritas. Os indivíduos desse gênero apresentam folhas do escamiformes, longas e decíduas, e aciculiformes, longas e em geral surgindo em fascículos de 2-5 acículas, presas em ramos laterais curtos, de entrenós estreitos, definindo a inserção das folhas em feixes. Além disso sua estrutura reprodutiva é composta por cones masculinos alongados, de até 4 cm de comprimento, dispostos em cachos, e cones femininos no formato de cilindros de até 15 cm de comprimento, com escamas lenhosas, persistentes, espessadas no ápice, cada uma contendo duas sementes aladas (ECKENWALDER, 2009; OTTATI, 2004).

O *Pinus*, em sua maioria, é natural de regiões frias, por isso ocorre naturalmente em grande parte do Hemisfério Norte, da zona boreal para os trópicos, estendendo-se das regiões árticas e subárticas da Eurásia e América do Norte para o sul das regiões subtropicais e tropicais da América Central, Mediterrâneo e Ásia (GERNANDT et al., 2005; PEREIRA 1990).

Dentre as inúmeras espécies que compõem o gênero, algumas se adaptaram bem às regiões Sul e Sudeste do Brasil, aonde foram introduzidas há mais de um século e são cultivadas em escala comercial há mais de 30 anos. Atualmente os plantios comerciais de *Pinus* no Brasil ocupam 1,6 milhão de hectares e concentram-se principalmente no Paraná (42%) e em Santa Catarina (34%). Quase que a totalidade dessa área é reflorestada com *Pinus taeda* e tem por finalidade, basicamente, abastecer os setores de celulose de fibras longas, painéis reconstituídos, construção civil, indústria moveleira e servir como fonte de energia (lenha industrial) (IBÁ, 2017; SHIMIZU, 2008).

### 3.2. *Pinus taeda* Linnaeus

A espécie *Pinus taeda* L., conífera da classe Pinopsida, ordem Pinales, família *Pinaceae*, é conhecida em todo o mundo como *Loblolly Pine*. Trata-se de um complexo de indivíduos monoicos, sem ocorrência de autofecundação (autogamia) e pertencentes ao grupo das Gimnospermas (GERNANDT et al., 2005).

Em comparação com outras espécies do gênero, o *Pinus taeda* possui rápido crescimento, menores teores de resina e uma maior quantidade de galhos (SHIMIZU, 2008; TANG et al., 1998).

Além disso, ele pode chegar à maturidade sexual entre 10 e 15 anos de idade, no entanto, já foram observados povoamentos com idades entre 5 e 7 anos produzindo quantidades consideráveis de sementes (DORMAN, 1976; WAKELEY, 1951).

O *Pinus taeda* L. tem seu centro de origem localizado no sul e sudeste dos Estados Unidos. Essas regiões de ocorrência natural possuem clima úmido, temperado ameno, com verões quentes e longos. Precipitação média anual entre 1.020 a 1.520 mm e presença de 5 a 10 meses de geada dependendo da altitude. As temperaturas médias anuais variam de 13 a 24 °C, com mínima em situações extremas podendo chegar a 23 °C negativos (SHIMIZU, 2008).

Os indivíduos que compõem a espécie são exclusivamente diploides, com 24 cromossomos ( $2n = 24$ ). Ou seja, nas células desses indivíduos, os cromossomos se organizam em pares homólogos, e assim, para cada característica existem pelo menos dois genes, e cada um deles está localizado em um cromossomo homólogo (LEDIG, 1998).

A introdução do *P. taeda* no Brasil ocorreu em meados de 1948, pelo Serviço Florestal do Estado de São Paulo, juntamente com as espécies de *P. palustris*, *P. echinata* e *P. elliottii*. A espécie encontrou condições ideais de desenvolvimento nos planaltos das regiões Sul e Sudeste, em função do clima fresco, inverno frio e disponibilidade constante de umidade ao longo do ano. Destacou-se logo no início, com o *P. elliottii*, devido, basicamente, à facilidade de cultivo, crescimento rápido e bom desenvolvimento (SHIMIZU, 2008; WEGRZYN et al., 2014).

Os primeiros plantios comerciais, no território brasileiro, surgiram a partir de 1966, estimulados, principalmente, pela política de incentivos fiscais, com o intuito de substituir a madeira de *Araucaria angustifolia*, em grande processo de exploração (MONTAGNA e YAMAZOC, 1978).

Atualmente, existem registradas no Ministério da Agricultura (MAPA), através do registro Nacional de Cultivares (RNC), 37 cultivares de *P. taeda*.

### 3.3. Melhoramento genético do *Pinus taeda*

Os primeiros plantios comerciais de *P. taeda* no território brasileiro foram realizados com base na importação de sementes dos Estados Unidos da América. A ausência de seleção e controle de qualidade das sementes resultaram em florestas pouco produtivas e com uma série de problemas, tais como, excesso de árvores bifurcadas, tortuosas e com grande quantidade de ramos grossos (SHIMIZU, 2008).

Com o intuito de aumentar a qualidade e uniformidade das florestas de *Pinus taeda*, iniciou-se um processo de seleção dos indivíduos com base nas características desejáveis. Tendo em vista, principalmente, uma maior adaptabilidade da espécie e aumento de ganhos em produtividade.

A seleção é uma etapa dentro de um processo contínuo de obtenção de novos genótipos superiores para os caracteres de interesse. No processo de melhoramento genético a diversidade genética da espécie é explorada a fim de promover combinações e obter ganhos, ao longo das gerações segregantes.

As espécies perenes, como é o caso do pinus, possuem ciclo longo e isso faz com que os programas de melhoramento necessitem de muitos anos para atingir os ganhos oriundos da seleção. Visto que, para melhorar uma população são necessários os seguintes passos: obtenção de uma população base, seleção, recombinação dos indivíduos selecionados e ainda, o teste de desempenho dos recombinantes (MERCER, 2011). Todo esse processo pode levar mais de 40 anos, haja visto que, tradicionalmente o processo de seleção em povoamentos de *Pinus taeda* é realizado próximo à idade de 15 anos (idade de rotação) (DORMAN, 1976). E apenas após esse período e com base nos resultados dos testes de progênies é possível realizar a seleção dos melhores indivíduos que irão constituir a nova população de seleção.

No entanto, mesmo com tanto tempo despendido, tem-se somente o controle materno, visto que, geralmente, a origem do pólen não é conhecida. Fator que pode induzir a ocorrência de depressão por endogamia, devido, principalmente, ao cruzamento de indivíduos aparentados (MERCER, 2011).

Assim, com o intuito de diminuir o tempo gasto para obtenção dos ganhos com a

seleção e ainda evitar os problemas citados acima, pesquisadores passaram a fazer uso dos marcadores moleculares. Esta ferramenta permite acessar parte do genoma e obter informações a respeito dos indivíduos que compõem a população de seleção. Com isso, a seleção das melhores plantas pode considerar essas informações genotípicas, além das características quantitativas e qualitativas. O que permite uma melhor alocação dessas plantas nos pomares de sementes ou pomares clonais (NEALE e KREMER, 2011). Por exemplo, plantas mais próximas geneticamente, podem ficar mais distantes uma da outra, com uma menor ocorrência de polinização entre elas e, conseqüentemente, com menores problemas relacionados à depressão endogâmica.

### **3.4. Diversidade genética em Pinus**

A diversidade genética é resultado das variações herdáveis presentes dentro de populações e/ou indivíduos. E está diretamente relacionada à ocorrência de fatores como mutação, seleção, deriva genética, endogamia e fluxo gênico. Esses fenômenos, de maneira geral alteram a distribuição e a frequência dos alelos dentro da população, no tempo e no espaço (GRATTAPAGLIA, 2007; LOWE et al., 2005).

Em espécies perenes tropicais a diversidade genética geralmente é maior dentro de suas populações. Isso ocorre em função dos seus poderosos mecanismos de fluxo gênico (dispersão de pólen e sementes). O que faz com que a diversidade genética entre as populações seja reduzida (KAGEYAMA et al., 2003; LOVELESS e HAMIRICK, 1984).

Nesse contexto, a morfologia das sementes do *Pinus taeda*, aladas e muito pequenas, facilita sua dispersão a longas distâncias, pelo vento. Fator que contribui para sua diversidade genética e para a colonização de áreas abertas.

Outra característica que influencia na diversidade da espécie é a monoicia. Embora presentes na mesma planta, as estruturas reprodutivas masculina e feminina ocorrem em separado. Os megásporos e as sementes são produzidos em cones, e os micrósporos em estróbilos. Assim, a polinização realizada pelo vento será responsável pelo transporte do estróbilo até o gametófito feminino para realização da fecundação (SADAVA et al., 2009).

Por serem plantas monoicas predominantemente alógamas, a polinização aberta pode levar a obtenção de populações de famílias de meios-irmãos. Esse fato pode originar indivíduos com certo grau de parentesco, que, embora existente, é inferior ao obser-

vado quando ocorre o fenômeno de autogamia.

Assim, as características reprodutivas e ciclo de vida são fatores que afetam a diversidade genética de uma população e sua compreensão e conhecimento são de grande importância para uma adequada condução do processo de melhoramento.

As frequências alélicas das características de interesse, também é fator importante no entendimento da diversidade genética. Representada pela razão entre o número de alelo por loco e o número total de alelos para cada loco, ela permite quantificar o nível de variação genética existente dentro ou entre populações. Com isso, as possibilidades de combinações e cruzamentos favoráveis também serão maiores (SOUZA et al., 2010).

A partir das frequências alélicas, as estimativas de heterozigosidade permitem quantificar o índice de fixação ( $f$ ), que avalia se as frequências de locos heterozigotos e homozigotos estão dentro do esperado para uma população em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (KAGEYAMA et al., 2003). Condição segundo a qual toda e qualquer população suficientemente grande, com cruzamentos aleatórios, sem ter passado por processos de seleção, mutação ou migração, estão em completo equilíbrio e tendem a permanecer com suas frequências alélicas e genotípicas constantes ao longo de suas gerações (HARDY, 1908; WEINBERG, 1908).

A partir das frequências alélicas é possível também calcular as distâncias genéticas entre os indivíduos estudados. Elas são obtidas com base em fórmulas matemáticas que determinam o grau de divergência genética existente entre eles, gerando uma matriz que permite conhecer estas semelhanças e diferenças. A menor distância genética obtida tem valor igual a zero, nesse caso não há diferença entre os dois indivíduos ou populações. No entanto, caso os indivíduos não apresentem alelos em comum para os locos testados, os valores de distâncias genéticas devem apresentar valor máximo, geralmente igual a 1. Atualmente existem vários métodos capazes de calcular distâncias genéticas. Dentre eles, o proposto por Nei em 1972 tem sido bastante utilizado (CRUZ et al. 2011; NEI, 1972).

Apesar da sua importância para as análises genéticas, a interpretação e identificação de grupos a partir da matriz de distâncias genéticas não é tão simples, principalmente quando a matriz resultante é muito extensa. Por isso é essencial a utilização de técnicas que possibilitem visualizar as distâncias obtidas por meio de gráficos de agrupamentos, como dendrogramas ou árvores filogenéticas.

Dentre os métodos de agrupamentos existentes, os hierárquicos estão entre os mais utilizados. Nele, o processo de agrupamento se repete várias vezes até que todos os indivíduos estejam agrupados. Dentro desta categoria destaca-se o UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages*), um método de agrupamento que caracteriza a dissimilaridade com base nas médias genéticas não ponderadas. Assim como todos os outros métodos, o UPGMA gera resultados aproximados e isso pode acarretar em formação de grupos não confiáveis. Por isso, é de suma importância avaliar o coeficiente de correlação cofenética, pois quanto maior for este coeficiente, melhor será a concordância entre a matriz de distâncias genéticas e o dendrograma (CRUZ et al., 2011).

Conhecer a diversidade genética é de suma importância para o sucesso de qualquer programa de melhoramento, pois permite ao melhorista selecionar genótipos superiores para as características de interesse. Além disso, sua manutenção ao longo dos ciclos de seleção garante a obtenção dos ganhos genéticos (GRATTAPAGLIA, 2007; LOWE et al., 2005).

Análises e estudos de polimorfismos de proteínas e de sequências de DNA têm proporcionado consideráveis incrementos aos ensaios de diversidade genética. Com destaque para o uso de marcadores moleculares, que sejam altamente polimórficos e com altas taxas de mutações (SCHLÖTTERER, 2004).

### **3.5. Marcadores Moleculares**

Os Marcadores Moleculares têm sido amplamente utilizados em estudos de diversidade genética, pois detectam diferenças em nível de DNA sem considerar os efeitos advindos do ambiente. Tratam-se de sequências (“marcas”) presentes no material genético de um indivíduo, herdadas geneticamente e que, não estão necessariamente relacionadas com características fenotípicas expressas. Essas marcas permitem diferenciar geneticamente dois ou mais indivíduos (BORÉM, 2009).

Essa diferenciação ocorre por meio da análise da presença de variações nas regiões gênicas (mutações). Técnicas que utilizam os marcadores moleculares permitem detectar esses polimorfismos. Em síntese, elas são divididas em dois grupos: as baseadas em hibridação e as baseadas em PCR (Reação em cadeia da Polimerase). Além disso, os marcadores podem ser classificados como dominantes ou codominantes. Ou seja, em indivíduos diploides, os marcadores codominantes permitem a visualização de am-



bos os alelos homólogos de um loco. Já os marcadores dominantes são menos informativos pois não permitem que fenótipos heterozigóticos sejam distinguidos dos homozigóticos (COUTINHO et al., 2006; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; TURCHETTO-ZOLET e ZANELLA, 2017).

Dentre os marcadores baseados em hibridação estão os RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (BOTSTEIN et al., 1980) e os Minisatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) (JEFFREYS et al., 1985).

Mais tarde, com o desenvolvimento da PCR, técnica que é capaz de amplificar regiões específicas do DNA *in vitro*, surgiram vários marcadores revelados por ela. Dentre eles, podem ser citadas as técnicas RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) (WILLIAMS et al., 1990), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) ou ASA (*Amplified Specific Amplicon*) (PARAN e MICHELMORE, 1993), ISSR (*Inter-simple sequence repeats*) (ZIETKIEWICZ et al., 1994), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VOS et al., 1995) e o SSR (*Simple Sequence Repeats*) (TAUTZ, 1989). Esses marcadores necessitam de uma pequena quantidade de DNA para que possam ser estudados (FALEIRO, 2007; TURCHETTO-ZOLET e ZANELLA, 2017), um dos principais fatos que os tornou popular em estudos genéticos.

A maioria das técnicas aqui citadas já foram aplicadas em diversos estudos com o intuito de analisar geneticamente espécies de Pinus. Em geral, todas elas possuem uma série de vantagens e limitações. A escolha da técnica ideal depende, dentre outros fatores, do objetivo a qual se destina o estudo, da disponibilidade de recursos financeiros e do nível de informações genéticas disponíveis a respeito da espécie de interesse (PLOMION et al., 2007; FALEIRO, 2007).

Em particular, os marcadores microssatélites são muito utilizados em espécies de Pinus, devido principalmente a seus inúmeros atributos favoráveis, tais como: alto grau de polimorfismo, reprodutibilidade, multialelismos e expressão codominante (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; FURLAN et al., 2007; GRATTAPAGLIA et al., 2014; MERCER, 2011; PHONG et al., 2015; PHONG et al., 2016).

### **3.6. Marcadores Microssatélites**

Os Marcadores Microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) são sequências de DNA compostas de um a seis nucleotídeos (sequências curtas) repetidas lado a lado, detectadas com a utilização de iniciadores específicos para a espécie de interesse.

Sua detecção ocorreu inicialmente em 1989, com a realização de estudos genéticos em humanos. A partir daí, eles foram observados em praticamente todos os organismos e em qualquer região do genoma, ou seja, tanto em regiões codificadoras (éxons) quanto em regiões não codificadoras (íntrons). No entanto, sua ocorrência é maior em regiões não codificadoras (FALEIRO, 2007; LITT e LUTY, 1989; TÓTH et al., 2000; WEBER e MAY, 1989).

Com base na quantidade de regiões repetidas, os microssatélites são classificados como: mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos, para repetições de 1 a 6 pares de bases, respectivamente. Além disso, eles podem ser classificados em perfeito - sua sequência de repetição não apresenta nenhuma interrupção por qualquer par de bases que não a pertença; imperfeito - caso possua algum par de bases que não coincida com a sequência repetida; interrompido - quando existe uma pequena sequência dentro do motivo repetido que seja diferente da repetição; ou composto - quando há a ocorrência de duas sequências distintas dentro do mesmo motivo (KAILA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2006; TAUTZ, 1989;).

O estudo dos microssatélites é uma das técnicas mais utilizadas para a detecção de polimorfismos entre as sequências de DNA, evidenciando desta maneira a diversidade genética. Em espécies de plantas, eles se destacam especialmente em estudos de indivíduos heterozigotos e diploides, isso porque, eles possuem um caráter codominante, ou seja, em condição de eletroforese permitem, quando disponível, a visualização de ambos os alelos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; GRATTAPAGLIA, 2007; LITT e LUTY, 1989; WEBER e MAY, 1989).

Além disso, são marcadores multi-alélicos, com alto grau de polimorfismo, que além de possuírem uma alta reprodutibilidade e simplicidade na análise técnica (PCR), apresentam baixo custo e ainda são transferíveis entre as gerações (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; GRATTAPAGLIA, 2007).

Ao trabalhar com os marcadores microssatélites, deve-se atentar para a existência de algumas limitações provenientes do seu estudo. Uma delas é a ocorrência de alelos nulos ou silenciosos, devido a ocorrência de mutações em suas regiões flanqueantes. Isso pode acarretar em uma identificação equivocada, haja visto que, indivíduos heterozigóticos podem ser identificados como indivíduos homozigóticos. Além disso, também pode ocorrer a homoplasia, que é a existência de alelos idênticos, porém que não estão

relacionados com uma comum ancestralidade e sim com a ocorrência de processos mutacionais similares. A existência de homoplasia faz com que haja diminuição no número de alelos, na proporção de indivíduos heterozigóticos e na diversidade genética (ESTOUP et al., 2002; JARNE e LAGODA, 1996).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Material vegetal**

O estudo foi realizado com 124 plantas de *Pinus taeda* pertencentes a Empresa Gerdau S/A. Uma amostra de tecido vegetal (acículas) foi coletada em cada uma dessas plantas. Estas amostras foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos com suas devidas identificações e enviadas para o Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal (LGBF) do Departamento de Engenharia Florestal da UFVJM, localizado no *Campus JK*, em Diamantina, MG, onde permaneceram armazenadas em ultrafreezer a uma temperatura de -80 °C, até o momento das análises.

### **4.2. Extração do DNA genômico total**

A extração do DNA genômico total deu-se a partir das acículas das plantas, segundo o protocolo CTAB 2% de Doyle e Doyle (1987), modificado. Para aplicação do protocolo primeiramente foi realizada a maceração de aproximadamente 100 mg do material vegetal de cada amostra em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Em seguida, adicionou-se ao macerado uma série de reagentes, seguidos de centrifugação e incubação em banho-maria, processo que resultou em um precipitado (peléte) como produto final.

Ao final do processo de extração e secagem do precipitado obtido, o material genético foi ressuscitado em uma solução de Tris/EDTA (TE 10:0,1) a pH 8,0 com Ribonuclease A (RNaseA), incubado à temperatura de 37 °C por 30 minutos para ação da enzima e armazenadas em freezer -20 °C para posterior utilização.

### **4.3. Análise qualitativa e quantitativa do DNA**

A qualidade e integridade das amostras de DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v), em tampão TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA), previamente corado com Brometo de Etídeo (0,2 mg/ml) e visualizado sob luz ultravioleta. Além

disso, a densidade óptica foi mensurada em espectrofotômetro. E com base nisso, as concentrações de cada amostra foi ajustada para aproximadamente 10 ng/2 µl (concentração de trabalho).

#### 4.4. Amplificação dos Marcadores Microsatélites via PCR

Para a realização do estudo foram selecionados 10 pares de iniciadores microsatélites específicos para *Pinus taeda*, suas sequências encontram-se dispostas na Tabela 1. Dentre eles, sete se tratavam de locos genômicos *pttx*, dois locos genômicos *ript* e um loco *sifg* derivado de EST. Com exceção do *Pttx2037* que era um tetranucleotídeo, todos os outros eram trinucleotídeos (ECHT e MAYMARQUARDT, 1997; ECHT et al., 2011; ELSIK et al., 2000; ELSIK e WILLIAMS, 2001). Esse conjunto de iniciadores permitiu que várias regiões do Genoma do *Pinus taeda* fosse fenotipada, tornando fidedignos os resultados das análises.

Em seguida, identificou-se a temperatura ótima de pareamento de bases para cada iniciador. Para isso, utilizou-se dez amostras de DNA com boa qualidade e integridade, que após terem suas concentrações ajustadas para aproximadamente 10 ng/µl, formaram uma amostra composta (*bulk*) que foi submetida a PCR a um volume final de 13 µL de reação, sendo: 20 ng (2 µl) do *bulk* de amostras de DNA, 6,87 µl de água tipo I esterilizada, 1,30 µl de tampão (10x), 0,52 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,11 µl de dNTP's, 1 µl de cada iniciador (direto (F) e reverso (R)) e 0,20 µl da enzima *Taq* DNA polimerase (5U/µl).

**Tabela 1:** Sequências dos 10 iniciadores microsatélites utilizados no estudo.

<b>Marcador</b>	<b>Primer Direto</b>	<b>Primer Reverso</b>
<b>Ript0255</b>	TCCTCCTGAGTGGTCCCATA	ATGGATATGAGGCCTGTTGG
<b>Pttx3081</b>	GCCGAGGAAGCAAGCAACCAA	CCTCGGCAGCCAAATCCTTCA
<b>Pttx2080</b>	AAAGATGGTCGGTTGTAAAGTT	GTCAGGCGGATAAGGTT
<b>Ript0031</b>	CCAACCAATGTGGTTCATCA	AGGAAAATAGAAGGGAATAAGACC
<b>Pttx3011</b>	AATTTGGGTGTATTTTCTTAGA	AAAAGTTGAAGGAGTTGGTGATC
<b>Pttx4093</b>	TTGCTTTGCTAATGTTGACCTG	CTAGAGTATGCCTTGAGC
<b>Pttx4137</b>	CATTGTATTAGTCCTAGCCTCTGT	GGTGCACCCAACAATGTG
<b>Pttx2037</b>	GCCTTTAGATGAATGAACCCA	AAGCGGGATATTATAGAGTTT
<b>Pttx3117</b>	GTGATTGATGAGGAGGCTTACT	AGGGACTGGCACCGATGAA
<b>Sifg3145</b>	TGTATATTCGCCCTGGTGGT	ATCAAATCCAGAATCAGGCG

As reações foram submetidas à amplificação em Termociclador BIORAD modelo *MyCycler*, em um programa de 40 ciclos, configurado com as seguintes temperaturas e tempo: 96 °C durante 2 minutos (desnaturação inicial); 94 °C por 1 minuto (desnaturação cíclica); gradiente de temperatura por 1 minuto (pareamento de bases); 72 °C por 1 minuto (extensão cíclica); 72 °C por 7 minutos (extensão final); e 4 °C até a retirada das amostras do equipamento. As temperaturas de pareamento de bases testadas foram: T1= 50 °C; T2= 51 °C; T3= 53 °C; T4= 55 °C; T5= 59 °C; T6= 62 °C; T7= 64 °C; T8= 65 °C.

Após a amplificação, os produtos da PCR foram separados em gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata, e analisados visualmente. Onde avaliou-se a presença ou ausência de bandas no gel, para cada temperatura testada.

Definida a temperatura ótima de pareamento de bases, amplificou-se todas as amostras objeto do estudo, com cada par de iniciador em sua respectiva temperatura ótima, com isso, foram obtidas um total de 1.024 reações. Nesta etapa, utilizou-se o mesmo programa de amplificação descrito anteriormente.

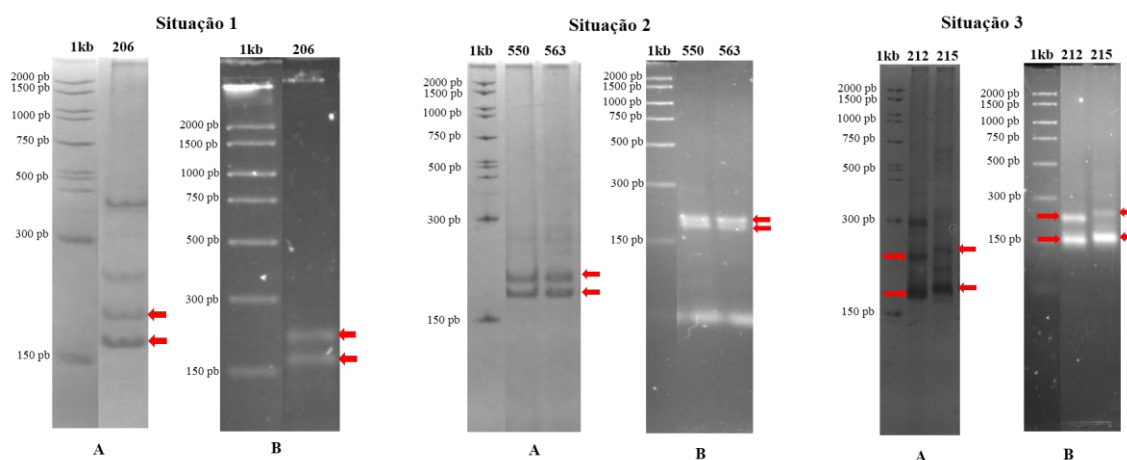
Os produtos da PCR foram separados em gel de poliacrilamida não desnaturante a 6%, corado com nitrato e em gel de agarose a 3%, corado com Brometo de Etídeo. No entanto, é importante ressaltar que o tamanho de cada fragmento foi obtido com base na separação em gel de poliacrilamida, devido sua alta capacidade de detecção e resolução.

#### **4.5. Problemas metodológicos**

O uso comparativo dos géis de poliacrilamida não desnaturante a 6% e de agarose a 3% nas análises das amplificações permitiu uma maior acurácia na distinção dos padrões de polimorfismo. Isso porque, a alta capacidade de detecção e resolução fornecidas pelos géis de poliacrilamida, esbarram na possível visualização de bandas fantasmas (*stutters*) inesperadamente amplificadas. Além disso, a determinação de um alelo apresenta caráter empírico e dedutivo, sendo altamente dependente das habilidades do analista, da qualidade e da eficiência informativa do gel. Assim, ao realizar a detecção dos alelos, concomitantemente, nos géis de poliacrilamida e agarose foi possível evitar equívocos resultantes da dificuldade de assegurar a legitimidade dos resultados.

No decorrer das análises verificaram-se três situações passíveis de erro, caso apenas um dos géis tivesse sido utilizado (Figura 2). Cabe enfatizar que esse tipo de problema também ocorre quando as amostras são separadas por capilaridade, em anali-

sador de DNA automático (sequenciador capilar com tecnologia Sanger) e é muito comum na literatura (Figura 3 - A).

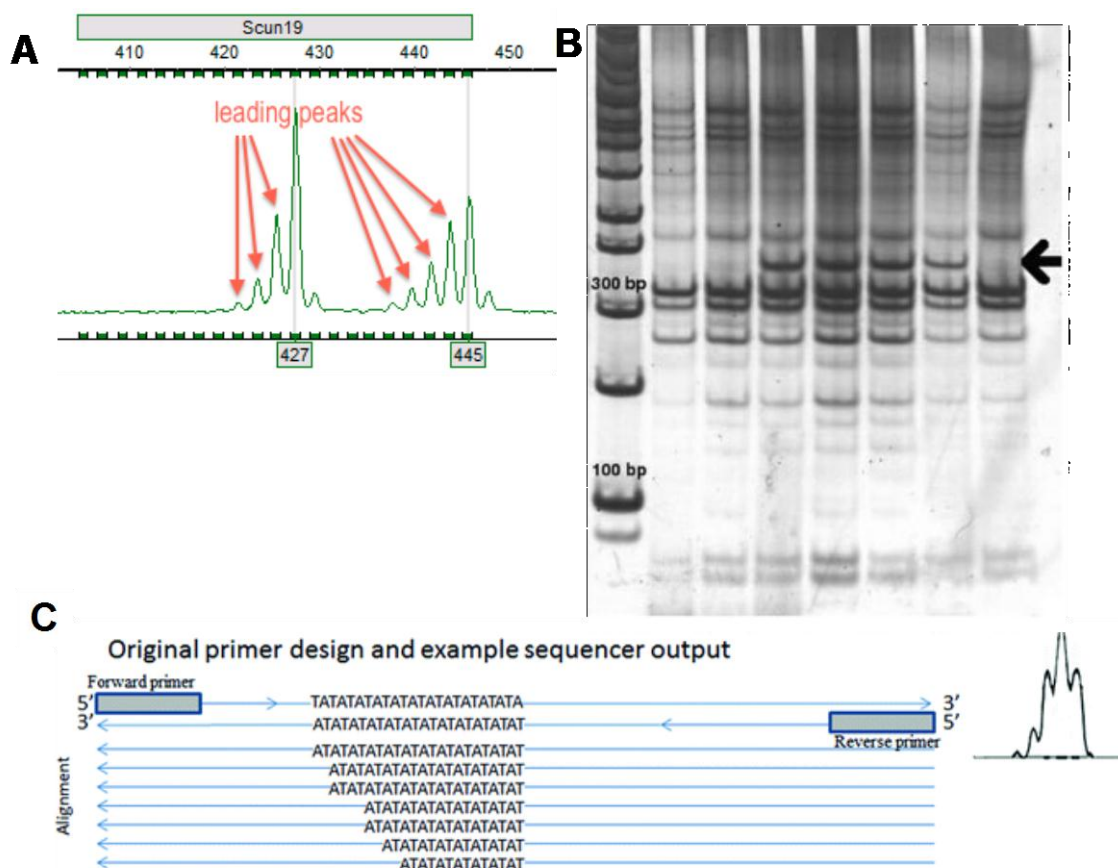


**Figura 1.** Análise comparativa das amplificações por PCR. A – em gel de poliacrilamida não desnaturante a 6%; B – em gel de agarose a 3%. Situação 1 – ocorrência de *stutters*; Situação 2 - análise de alelos com valor aproximado de peso molecular; Situação 3 – detecção de polimorfismo entre as amostras. Onde, são destacados pelas setas os alelos considerados nas análises.

O primeiro entrave refere-se a uma situação habitual em estudos realizados com marcadores moleculares microssatélites, o aparecimento de *stutters* (Figura 2 - Situação 1). Os *stutters* ou bandas fantasmas são fragmentos que não correspondem a regiões reais do genoma, pois são originadas durante o processo de amplificação por PCR, em momentos em que a enzima Taq DNA polimerase “perde” sua posição durante a cópia do fragmento de DNA. Em síntese, a enzima desliza para frente ou para trás em alguns poucos pares de bases e gera fragmentos com uma repetição de bases maior ou menor que o fragmento verdadeiro. As bandas fantasmas podem ocorrer imediatamente antes ou depois da banda real (JANAVICIUS et al., 2010; SHINDE et al., 2003).

Embora esta característica do gel de agarose seja favorável à análise, sua resolução pode apresentar-se como um problema passível de gerar equívocos durante a detecção. Sua baixa resolução aliada a reduzida capacidade de detecção de diferenças entre fragmentos com diferença pequena quanto ao número de pares de bases dificulta a distinção de alelos com pesos moleculares próximos (Figura 2 – Situação 2-B). E, ainda, limitam a análise de polimorfismos entre alelos muito parecidos, ou seja, quando a dife-

rença entre eles é de poucos pares de bases (Figura 2 – Situação 3-B). Assim, não permite afirmar com precisão se alelos que ocorrem em amostras diferentes, para um mesmo loco, possuem o mesmo tamanho.



**Figura 2.** Exemplos de ocorrência de *background* em análise microssatélites. Em “A” é mostrado um eletroferograma obtido em analisador de DNA automático. Em “B” é mostrado um gel de poliacrilamida e em C é esquematizado o “deslizamento” da Taq DNA polimerase, fato gerador de bandas *stutters*. **Fonte:** A - Luckau Protocols ([https://openwetware.org/wiki/Luckau\\_Protocols:Scoring](https://openwetware.org/wiki/Luckau_Protocols:Scoring)); B – Novelli et al., 2006; C - Flores-Rentería e Krohn, 2013.

Uma vez que, géis de poliacrilamida apresentam maior resolução que os géis de agarose, já que eles podem separar fragmentos entre 10 e 300 pb e identificar diferenças entre fragmentos da ordem de 5 a 10 pb. E, ainda, maior detecção, visto que, enquanto na agarose o limite de detecção é de 20 ng, na poliacrilamida corada com nitrato de pra-

ta esse limite pode ser de até 5 ng de DNA, a análise em géis de poliacrilamida permitiram a visualização de bandas mais nítidas e delimitadas (Figura 2 – Situação 2-A), além de permitir uma melhor identificação e determinação dos polimorfismos (Figura 2 – Situação 3-A). Assim, evidencia-se que, a análise conjunta dos géis permite maior segurança na seleção dos alelos, ao possibilitar a confirmação exata dos resultados.

#### 4.6. Análises estatísticas

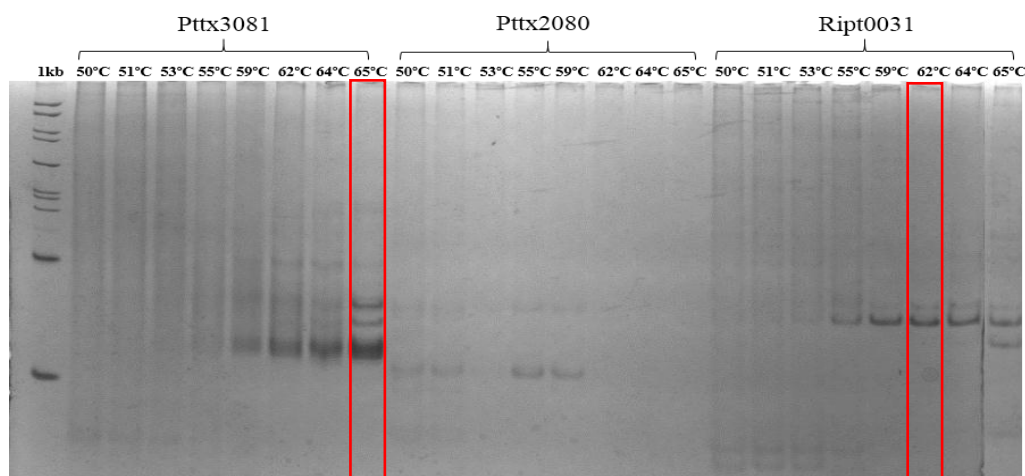
As análises estatísticas foram obtidas por meio do uso do programa CERVUS 3.0 (MARSHALL, 1998) e *Software R (R Development Core- Team, 2018)*. Foram calculados o número de alelos observados, as heterozigosidades observada e esperada, o conteúdo de informação polimórfica, o equilíbrio de Hardy-Weinberg e a frequência estimada de alelos nulos. A partir da matriz de distância genética de Nei (NEI, 1972) um agrupamento genético foi obtido por meio do algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages*).

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A escolha da temperatura ótima de pareamento entre os marcadores e a molécula de DNA mostrou-se indispensável. Uma vez que, diminui a ocorrência de amplificações inespecíficas e bandas fantasmas (*stutters*) que podem ser confundidas com os verdadeiros alelos. A Figura 1 mostra os resultados do teste de temperatura para três locos, onde pode-se observar em destaque as temperaturas ótimas obtidas para o Pttx3081 e Ript0031 e ainda os resultados não satisfatórios para o Pttx2080 que deu origem a bandas fracas e inespecíficas.

A análise do teste de temperatura, para todos os locos testados, permitiu verificar que as melhores amplificações ocorreram a uma temperatura de 59 °C para os locos Pttx3011 e Pttx2037, 62 °C para os locos Ript0031 e Pttx3117 e 65 °C para o Pttx3081. A escolha baseou-se na observação de bandas bem definidas, de alta intensidade, livre ou com presença bem reduzida de *stutters*.





**Figura 3.** Imagem do gel de poliacrilamida 6%, com separação de fragmentos obtidos por meio de PCR com bulk de amostras e três locos microssatélites específicos para *Pinus taeda*, submetidas a 8 temperaturas de pareamento.

Dos dez locos específicos selecionados para realização do estudo, cinco foram capazes de amplificar fragmentos polimórficos nos materiais genéticos, sendo eles: Pttx3081, Ript0031, Pttx3011, Pttx2037 e Pttx3117. Com uma porcentagem total de 1,29% de falhas de amplificação. Os outros cinco locos não foram considerados nas análises, visto que três deles (Ript0255, Pttx4093 e Pttx4137) não produziram fragmentos de amplificação, o Pttx2080, mesmo quando submetido a diferentes testes de temperaturas de pareamento de bases, deu origem a bandas com padrões inespecíficos ou de baixa qualidade e o Sifg3145 não detectou polimorfismos entre os genótipos.

As análises realizadas nos géis permitiram a identificação dos alelos dos cinco locos considerados nas avaliações, obtidos para cada uma das plantas em estudo. As frequências alélicas determinadas para cada loco polimórfico (Tabela 2) permitiram verificar que os alelos de maior frequência variaram de 0,8285 (alelo 155 do loco Pttx3011) a 0,5447 (alelo 235 do Ript0031). Para os alelos de menor frequência, a variação foi de 0,0041 (alelo 143 do Ript0031) a 0,0083 (alelo 156 e 175 do Pttx3081).

Estes resultados indicam que, caso não sejam realizados novos eventos de recombinação entre esses indivíduos, os alelos de maior frequência apresentarão uma maior possibilidade de se fixarem na população base ao longo dos cruzamentos dentro da população. Por isso, cabe ao melhorista avaliar a necessidade de mantê-los em alta ou de explorar novas recombinações a fim de aumentar a diversidade genética e consequentemente diminuir estas frequências alélicas.

**Tabela 2.** Frequências alélicas para cada loco estudado em 124 plantas de *Pinus taeda*.

<b>Loco</b>	<b>Alelo (pb)</b>	<b>Frequência</b>
<b>Pttx3081</b>	156	0,0083
	175	0,0083
	177	0,3347
	209	0,0124
	235	0,3888
	256	0,2479
<b>Ript0031</b>	180	0,1382
	207	0,0285
	235	0,5447
	254	0,1220
	270	0,1138
	305	0,0528
<b>Pttx3011</b>	118	0,1297
	135	0,0081
	143	0,0041
	155	0,8285
	175	0,0498
	200	0,0163
	206	0,0498
	221	0,0287
<b>Pttx2037</b>	120	0,0081
	143	0,0163
	150	0,0528
	156	0,0691
	170	0,1057
	180	0,2276
	190	0,4837
	260	0,0366
<b>Pttx3117</b>	191	0,7236
	195	0,2154
	200	0,0610

O número total de alelos para os cinco locos estudados foi de 31, dando origem a uma média de 6,2 alelos por loco. Os locos mais polimórficos foram o Pttx3011 e Pttx2037, que apresentaram 8 alelos cada um deles. Já o menos polimórfico foi o Pttx3117 com apenas 3 alelos por loco (Tabela 3).

Estes resultados foram distintos daqueles obtidos por Grattapaglia et al. (2014), que ao estudarem o desempenho dos marcadores microssatélites na atribuição de parentesco, em um pomar de sementes clonais de *Pinus taeda*, obtiveram 16, 18, 15, 12 e 4

alelos para os locos Pttx3081, Ript0031, Pttx3011, Pttx2037 e Pttx3117, respectivamente.

No entanto, dois fatores podem ter contribuído para esta diferença. Primeiramente, no estudo realizado pelos autores citados utilizou-se a eletroforese capilar para as análises de DNA, a qual permite a separação de fragmentos com apenas uma base de diferença. Essa precisão pode ter possibilitado uma segregação mais refinada dos fragmentos amplificados e, por consequência, a detecção de um maior número de alelos por loco. Contudo, a enzima Taq DNA polimerase adiciona uma base adenina (A) ao final da sequência amplificada e pode “deslizar” durante a amplificação, originando *stutters*. Assim, os alelos diferenciados por poucas bases podem resultar dessas características da enzima, e, não de diferenças existentes no DNA analisado.

O outro fator é que a separação dos fragmentos em géis apresenta um menor poder de separação e resolução dos fragmentos de DNA amplificados, que a eletroforese capilar. Em comparação à agarose, a poliacrilamida possui maior poder de separação e de resolução. Assim, ao separar os fragmentos amplificados em géis de agarose e de poliacrilamida foi possível, no presente estudo, ter maior confiança na atribuição de um dado fragmento a um alelo em específico. Por fim, as diferenças entre os dois estudos, realizados por Grattapaglia et al. (2014) e este, também, podem ter ocorrido em função do material genético utilizado.

A frequência dos alelos presentes nos diferentes locos dos genótipos que compõe uma população definirá sua estrutura. Variações consideráveis na distribuição das frequências alélicas entre os indivíduos podem representar uma estruturação da população. Ou seja, podem inferir que a composição genética da população está sofrendo influência de fenômenos como mutações, derivas genéticas e cruzamentos preferenciais.

O entendimento da diversidade genética da população é fundamental para o direcionamento do programa de melhoramento. Nesse sentido, identificar a ocorrência de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e estimar parâmetros como conteúdo de informação polimórfica (PIC), índice de fixação ( $f$ ) e heterozigosidade ( $H$ ) torna-se essencial para a melhor compreensão das características genéticas das plantas em estudo (MALHADO et al., 2008; CRUZ et al., 2011).

**Tabela 3.** Estimativas de diversidade genética para cinco locos microsatélites analisados em *Pinus taeda*, onde: N= Tamanho amostral; K= número de alelos detectados;  $H_{obs}$ = heterozigosidade observada;  $H_{esp}$ = heterozigosidade esperada; f= índice de fixação; PIC= conteúdo de informação polimórfica; HW= Teste do desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg e F(null)= Frequência estimada de alelos nulos.

Loco	N	K	Hobs	Hesp	f	PIC	HW	F(Null)
Pttx3081	121	6	0,6529	0,6781	0,0372	0,6090	***	0,0106
Ript0031	123	6	0,6016	0,6554	0,0821	0,6210	NS	0,0231
Pttx3011	122	8	0,5410	0,4660	-0,1609	0,4417	**	-0,1150
Pttx2037	123	8	0,5528	0,6966	0,2064	0,6576	***	0,1209
Pttx3117	123	3	0,5528	0,4280	-0,2916	0,3735	***	-0,1499
<b>Média</b>		6,2	0,5802	0,5848	-0,0254	0,5405		

De acordo com o conteúdo de informação polimórfica (PIC), que segundo Botstein et al. (1980), trata-se de uma estimativa que reflete a capacidade dos marcadores utilizados em detectar os polimorfismos existentes, os marcadores Pttx2037, Ript0031 e Pttx3081 foram classificados como muito informativos (PIC maior do que 0,5) e os marcadores Pttx3011 e Pttx3117 como medianamente informativos (PIC entre 0,25 e 0,5) (Tabela 3).

Uma vez que o uso dos marcadores tem por finalidade verificar a similaridade genética existente entre os indivíduos e, conseqüentemente, denotar a diversidade existente na população analisada, o PIC possui alta relevância para as análises, pois, ao permitir a avaliação do grau de heterozigosidade do loco, ele possibilita, concomitantemente, selecionar os marcadores mais informativos. Que por sua vez apresentam maior poder discriminatório das variações genéticas presentes nos genótipos analisados.

Assim, os valores de PIC obtidos permitiram inferir que os marcadores utilizados foram úteis para o estudo da diversidade genética desta população e ainda que a população analisada, mesmo após os diversos processos de seleção a qual foi submetida, detém em seus indivíduos certo grau de polimorfismo com conseqüente existência de diversidade genética. O que é muito importante em uma população de melhoramento, visto que a diversidade é necessária para sustentar a pressão de seleção.

Comumente, os valores obtidos para o PIC são inferiores aos da heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), e esta tendência pode ser observada nos resultados apresentados na Ta-

bela 3. A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,5410 a 0,6529, com média de 0,5802 e a  $H_e$  variou de 0,4280 a 0,6976, com média de 0,5848. O loco Pttx3081 apresentou o maior valor de  $H_o$  ( $H_o=0,6529$ ) e o Pttx3011 a menor ( $H_o= 0,5410$ ). A  $H_e$  foi maior no loco Pttx2037 ( $H_e=0,6966$ ) e menor no Pttx3117 ( $H_e= 0,4280$ ).

Analizando cada loco individualmente, os valores de heterozigosidade observada foram menores em relação à esperada para os locos Pttx3081, Ript0031 e Pttx2037 sugerindo para esses locos uma maior presença de homozigose com tendência a fixação dos alelos mais frequentes, além de maior possibilidade de ocorrência de cruzamentos entre indivíduos aparentados na população estudada (endogamia) e desequilíbrio da população devido a maior frequência de homozigotos em relação a heterozigotos.

Observa-se, também, que para os locos Pttx3011 e Pttx3117 os valores de heterozigosidade observada foram maiores em relação à esperada, sugerindo que eles apresentam uma maior quantidade de heterozigotos do que o esperado para uma população em equilíbrio de Hardy Weinberg, fato que pode ser responsável pela existência de certa diversidade dentro da população. Como já foi mencionado, espécies perenes, como é o caso do Pinus, podem apresentar maior diversidade dentro de suas populações do que entre elas, em função dos mecanismos de fluxo gênico. Esse fator permite a obtenção de plantios homogêneos e produtivos, com base nos cruzamentos realizados, sem necessariamente a ocorrência de depressão endogâmica e perda de vigor.

Observando o trabalho de Grattapaglia et al. (2014), foi possível detectar resultados em que também ocorreram a predominância de indivíduos homozigotos em relação aos heterozigotos para alguns locos. Este fato se dá por tratar-se também de uma população de melhoramento, onde os sucessivos cruzamentos podem levar a ocorrência da diminuição de genótipos em heterozigose.

Com base nos índices de heterozigosidade observada e esperada foi calculado o índice de fixação ( $f$ ). Este índice variou de -0,1609 a 0,2064 com média de -0,0254. Estimativas de índices de fixação maiores que zero indicam a ocorrência de endogamia entre os indivíduos da população, já índices menores do que zero evidenciam a ocorrência de acasalamento entre indivíduos não aparentados (BARROS, 2009). Conforme citado acima, o índice de fixação médio foi de -0,0254, indicando, nesta população, a não ocorrência de cruzamentos entre indivíduos aparentados. Esta estimativa confirma a existência de considerável diversidade genética entre os indivíduos estudados.

Alterações nas frequências alélicas podem promover desequilíbrio entre as proporções esperadas de indivíduos homozigotos e heterozigotos em uma população. Assim, outro parâmetro importante para auxiliar o melhorista nos estudos de seleção é o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Segundo Cruz et al. (2011), sua estimativa permite o estabelecimento de estratégias de melhoramento e manipulação da população. Isso é possível porque ele permite conhecer as frequências genotípica e alélica que ocorrerão numa próxima geração.

Neste estudo, dos cinco locos microssatélites analisados somente o loco Ript0031 apresenta equilíbrio. Ou seja, apenas as frequências alélicas observadas para esse loco tendem a permanecer constantes no decorrer das gerações, a menos que ocorram perturbações que interfiram na casualização dos cruzamentos.

O desequilíbrio observado para os demais locos pode ser explicado pela existência de seleção durante o estabelecimento do Pomar com vistas, principalmente, ao aumento da produtividade e uniformidade dos plantios resultantes desses materiais. O processo de seleção infringe uma das condições necessárias para que se mantenha o equilíbrio, ao promover perturbações nos genótipos. Isso ocorre, pois, a seleção não apenas reduz o tamanho da população, mas também direciona os cruzamentos possíveis. O que impede que os cruzamentos ocorram ao acaso, sem preferências. Contudo, se não houver nenhum distúrbio e as pressuposições de Hardy-Weinberg se fizerem presentes, com apenas uma geração de acasalamento ao acaso a população tenderá a entrar em equilíbrio (CRUZ et al. 2011).

A presença de alelos nulos e/ou a ocorrência de homoplasia podem ser, também, uma das causas do desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Uma vez que estes fatores levam a um excesso de indivíduos homozigóticos (DAKIN e. AVISE, 2004; ESTOUP et al, 2002; JARNE e LAGODA, 1996).

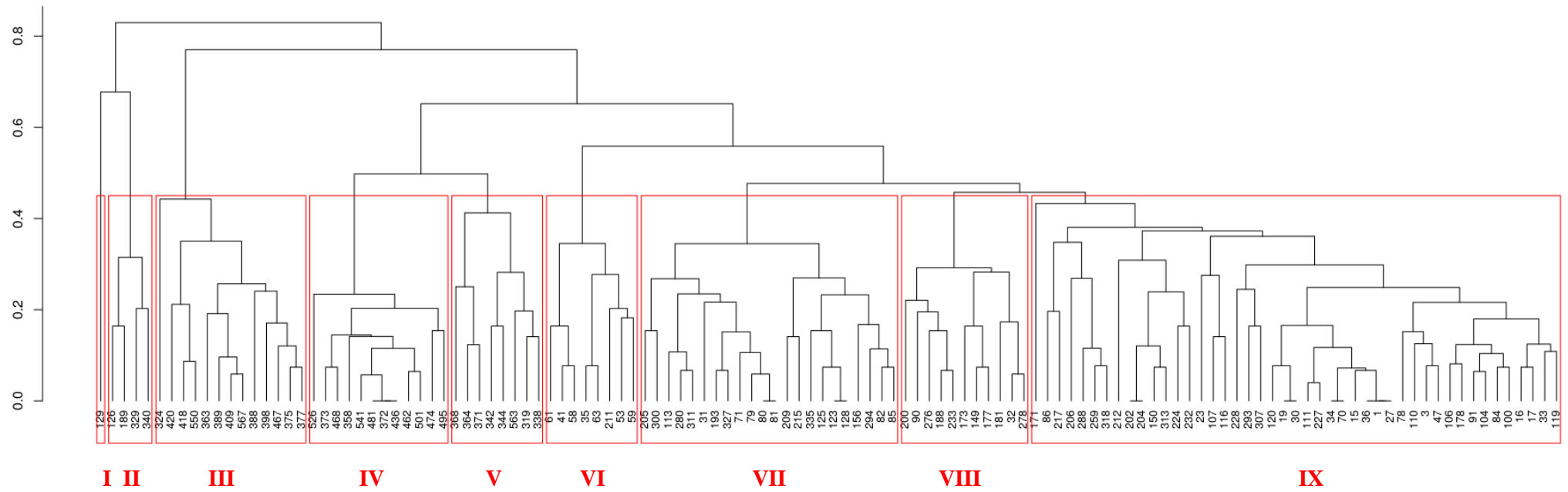
A ocorrência de alelos nulos é um relato bastante comum associado aos marcadores microssatélites. Segundo Callen et al. (1993), alelos podem não amplificar devido a mutações nas sequências nucleotídicas referentes às regiões flanqueadoras, ou seja, nas regiões que os marcadores reconhecem e se ligam. Esse fato impede o pareamento do marcador e consequentemente a amplificação do fragmento. O *software* Cervus 3.0 estima a frequência de alelos nulos com base na utilização de um algoritmo iterativo que

se baseia nas frequências observadas e esperadas dos genótipos (SUMMERS e AMOS, 1997).

Quando há a ausência de um alelo nulo para determinado loco, a frequência encontrada será próxima de zero com tendência a apresentar valores negativos, por outro lado, frequências de alelos nulos acima de 0,05 são significativas, ou seja, são locos que apresentam excesso de alelos nulos e consequentemente um excesso de homozigotos em relação a heterozigotos. Tais fatos explicam as frequências de alelos nulos obtidas. Uma vez que, para os locos em que a frequência de heterozigosidade observada foi maior que a esperada (Pttx3011 e Pttx3117) a frequência de alelos nulos mostrou-se com valores negativos. Além disso, somente o loco Pttx2037 apresentou uma frequência de alelos nulos maior do que 0,05 (0,1209), sendo assim, o único loco com frequência significativa e com um alto grau de relevância.

Compreendido que há certo grau de variabilidade genética entre as plantas analisadas, apesar das alterações estruturais observadas nas frequências alélicas e no equilíbrio da população. E, a fim de descrever a diversidade genética existente entre as plantas, com maior rigor. Procedeu-se a análise das distâncias genéticas. Assim, a partir da matriz de distância genética obtida por meio do índice de Nei (1972), construiu-se um dendrograma (Figura 2) e estabeleceu-se, empiricamente, uma linha de corte, a qual separou as plantas em nove grupos. Supõem-se que indivíduos pertencentes a um mesmo grupo possuem alta similaridade genética. Por outro lado, há uma alta divergência genética entre os grupos.

A análise do dendrograma permitiu observar elevada similaridade genética entre alguns indivíduos. Agrupamentos não aleatórios são passíveis de ocorrerem em populações com diferenciação na distribuição das frequências alélicas. Como, é o caso do conjunto de indivíduos analisados no presente estudo. Outro fator a ser considerado é que o *Pinus* é monoico e, predominantemente, alógamo, ou seja, a ocorrência de polinização ao acaso pode levar a obtenção de indivíduos meios-irmãos. Há, ainda, que se considerar a possibilidade de ter ocorrido uma duplicação dessas amostras no momento da coleta dos materiais para análise ou do plantio. Ou, ainda, que essa altíssima similaridade se deve a homogeneidade genética para os locos analisados. Por isso, outros marcadores microsatélites poderão ser testados nestas plantas a fim de confirmar ou não o alto parentesco entre elas.



**Figura 4.** Dendrograma com base na distância genética de Nei (1972) entre 124 plantas de *Pinus taeda*.



Dos nove grupos obtidos, o grupo IX apresentou o maior número de indivíduos (45 plantas), e o menor foi o grupo I, composto, apenas, pela planta 129. Esse genótipo parece ser o material mais distante geneticamente dos demais.

A fim de facilitar a visualização e o entendimento dos resultados obtidos no dendrograma, foi construída uma tabela composta pelos nove grupos e seus respectivos indivíduos (Tabela 4).

**Tabela 4.** Distribuição das 124 plantas nos nove grupos obtidos na análise de agrupamento (dendrograma).

Grupos											
I	II	III	IV	V	VI	VII		VIII	IX		
129	126	324	526	368	61	205	81	200	171	107	27
	189	420	373	364	41	300	209	90	86	116	78
	329	418	468	371	58	113	215	276	217	228	110
	340	550	358	342	35	280	335	188	206	293	3
		363	541	344	63	311	125	233	288	307	47
		389	481	563	211	31	123	173	259	120	106
		409	372	319	53	193	128	149	318	19	178
		567	436	338	59	327	156	177	212	30	91
		388	462			71	294	181	202	111	104
		398	501			79	82	32	204	227	84
		467	474			80	85	278	150	34	100
		375	495						313	70	16
		377							224	15	17
									232	36	33
									23	1	119

O agrupamento obtido é coerente com as informações que se tem a respeito do tipo de população em estudo e com as características da espécie. Uma vez que, tratam-se de materiais selecionados para fins de produção de sementes melhoradas para compor plantios comerciais, supõe-se a existência de diversidade genética entre eles. No entanto, também em decorrência da seleção, pode-se observar genótipos mais homogêneos geneticamente. Homogeneidade esta que, também, pode estar relacionada com a procedência das plantas estudadas e utilizadas para compor o pomar. A estrutura das populações segregantes obtidas a partir do pomar composto pelas plantas dependerá do direcionamento dos cruzamentos definidos a fim de promover a produção das sementes.

Assim, com o intuito de se obter plantios mais homogêneos, o cruzamento de genótipos geneticamente parecidos pode ser direcionado pelo melhorista. Por outro lado, caso o objetivo seja aumentar a diversidade genética, cruzamentos entre indivíduos mais divergentes podem ser realizados, com consequente exploração da heterose ou da segregação transgressiva.

## 6. CONCLUSÕES

Com base na análise da diversidade genética das 124 plantas, pode-se inferir que:

- A média do PIC foi de 0,5405 indicando que os locos, em sua maioria, são altamente informativos.
- A população não está em Equilíbrio de Hardy Weinberg.
- Dentre o material estudado, há indivíduos com genótipos semelhantes.
- O índice de fixação médio foi de -0,0254, indicando a não ocorrência de cruzamento entre indivíduos aparentados.

Estas e as demais informações obtidas poderão auxiliar no processo de melhoramento genético da população. A depender do objetivo do melhorista, a população e sua diversidade poderão ser manipuladas, mediante cruzamentos e seleção devidamente direcionados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, E. A. **Estrutura populacional e variabilidade genética do núcleo de conservação da raça marota no Piauí**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

BORÉM, A. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, UFV, p.532, 2009.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Society of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

CALLEN, D. F.; THOMPSON, A. D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H. A.; RICHARDS, R. P.; MULLEY, J. C.; SUTHERLAND, G. R. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)<sub>n</sub> Microsatellite Markers. **The American Society of Human Genetics**, v. 52, p. 922-927, 1993.

COUTINHO, H. D. M.; NETO, V. M.; VERDE, L. C. L. Técnicas com Marcadores Moleculares usadas nas ciências da saúde. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.10, n. 2, p. 177-188, 2006.

CRUZ, C. D., FERREIRA, F. M., PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Suprema. p. 620, 2011.

DAKIN, e.; AVISE, J. Microsatellite null aleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, p. 504-509, 2004.

DORMAN, K.W. The genetics and breeding of southern pines. Washington, USDA Forest Service, **Agriculture handbook**, v. 471, p. 407, 1976.

DOYLE, J.D.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v 19, p.11-15, 1987.

ECHE, C. S.; MAY-MARQUARDT, P. Survey of microsatellite DNA in pine. **Genome**, v. 40, n. 1, p. 9-17, 1997.

ECHE, C. S.; SAHA, S.; DEEMER, D. L.; NELSON, C. D. Microsatellite DNA in genomic survey sequences and UniGenes of loblolly pine. **Tree Genetics & Genomes**, v. 7, n. 4, p. 773–780, 2011.

ECKENWALDER, J. E. Conifers of the world: **Timber Press Inc.**, v.1, p. 720, 2009. 720 p.

ELSIK, C. G.; WILLIAMS, C. G. Low-copy microsatellite recovery from a conifer genome. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 1189–1195, 2001.

ELSIK, C. G.; MINIHAN, V. T.; HALL, S. E.; SCARPA, A. M.; WILLIAMS, C. G. Low copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. **Genome**, v. 43, p. 550–555, 2000.

ESTOUP, A.; JARNE, P.; COURNET, J. M. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1591-1604, 2002.

FALEIRO, F. **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina-DF, Embrapa Cerrados, p. 102, 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília, EMBRAPA-CENARGEN, p. 55-62, 1998.

FLORES-RENTERÍA, L.; KROHN, A. Scoring microsatellite loci. **Methods in Molecular Biology**, v. 1006, 2013.

FURLAN, R. A.; MORI, E. S.; TAMBARUSSI, E. V.; MORAES, C. B.; JESUS, F. A.; ZIMBACK, L. Estrutura genética de populações de melhoramento de *Pinus caribaea* Var. *Hondurensis* por meio de marcadores microsatélites. **Bragantia**, v. 66, n. 4, p.553-563, 2007.

GERNANDT, D. S.; LÓPEZ, G. G.; GARCÍA, S. O.; LISTON, A. Phylogeny and classification of *Pinus*. **Taxon**, v. 54, n.1, p. 29-42, 2005.

GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. **Biotecnologia Florestal**, p. 177- 200, 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; DIENER, P. S.A.; SANTOS, G. A. Performance of microsatellites for parentage assignment following mass controlled pollination in a clonal seed orchard of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **Tree Genetics & Genomes**, v. 10, p. 1631-1643, 2014.

HARDY, G.H. Mendelian proportions in a mixed population. **Science**, v. 78, p. 49-50, 1908.

IBÁ Indústria Brasileira de Árvores – **Relatório Ibá 2017**. Brasília, DF, 2017. Disponível em: [http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2017.pdf](http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf)> Acesso em: 06/06/2018.

JARNE, P. e LAGODA, P. Microsatellites: from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 424-429, 1996.

JANAVICIUS, R.; MATIUKAITE, D.; JAKUBAUSKAS, A.; GRISKEVICIUS, L. Microsatellite instability detection by high-resolution melting analysis, Clin. Chem.v. 56, n. 11, p. 1750–1757, 2010.

JEFFREYS, A.J.V., WILSON, R., THEIN S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, v. 314, p. 67-73, 1985.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, B. F.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENCOSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Florestalis**, v. 64, p. 93-107, 2003.

KAILA, R. K.; RAI, M. R.; KALIA, S.; SLINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: on overview of the recent progress in plants. **Euphytica**. v. 177, p. 309-334, 2011.

LEDIG, F.T. Genetic variation in *Pinus*. In: RICHARDSON, D.M (ed) **Ecology and Biogeography of Pinus**. Cambridge Uni Press, Cambridge, UK, p 251- 280, 1998.

LITT, M. AND LUTY, J.A. A Hypervariable Microsatellite Revealed by in Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 397-401, 1989.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Ecology Systematics**, v. 15, p. 65-95, 1984.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. Ecological genetics: design, analysis, and application. **Oxford: Blackwell Publishing**, p. 326, 2005.

OPEN WET WARE CONTRIBUTORS. **Luckau Protocols:Scoring**, 2013. Acesso em: 26/08/2018 URL:<[https://openwetware.org/mediawiki/index.php?title=Luckau\\_Protocols:Scoring&oldid=700763](https://openwetware.org/mediawiki/index.php?title=Luckau_Protocols:Scoring&oldid=700763)>.

OTTATI, A. L. T. **ASPECTOS BIOECOLÓGICOS DO PULGÃO-GIGANTE-DOPINUS, *Cinara atlantica* (WILSON, 1919) (HEMIPTERA: APHIDIDAE), EM *Pinus* spp. (PINACEAE)**. Botucatu, São Paulo, p. 133, 2004.

MALHADO, C.H.M.; CARNEIRO, P.L.S.; PEREIRA, D.G.; MARTINS FILHO, R.; SOUZA, J.C. Progresso genético e estrutura populacional do rebanho Nelore no Estado da Bahia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.9, p.1163-1169, 2008

MARSHALL, T.C.; SLATAE, J.; KRUUK, L. E. B. ; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639–655, 1998.

MERCER, J .R. **Estrutura genética de uma população selecionada de *Pinus taeda* linnaeus**. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento [MAPA] 2018. **Registro Nacional de Cultivares**. Disponível em: <[http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares\\_registradas.php](http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php)>. Acesso em: 25 set. 2018

MONTAGNA, R. G.; YAMAZOC, G. **Utilização da madeira de pequenas dimensões**. Silvicultura, São Paulo, v.2, n.14, p.178-179, 1978.

NEALE, D.B.; KREMER, A. Forest tree genomics: growing resources and applications. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n.2, p. 111-22, 2011.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, Chicago, v. 106. p. 283-292, 1972.

NOVELLI, V. M.; CRISTOFANI, M.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 29, n. 1, 2006.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, 2006.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Developmente of reliable PCR-based markers linkage to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetic**, v. 85, p. 985-993, 1993.

PEREIRA, B. A. da S. Introdução de coníferas no Brasil, um esboço histórico. **Caderno de Geociências. IBGE**, Brasília, v. 4, p. 25-38, 1990.

PHONG, D. T.; LIEU, T. T.; HIEN, V. T. T.; HIEP, T. N. Genetic diversity of the endemic flat-needle pine *Pinus Krempfii* (Pinaceae) from Vietnam revealed by SSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 7727-7739, 2015.

PHONG, D. T.; HIEN, V. T. T.; LIEU, T. T.; HIEP, N. T. Genetic diversity in the natural populations of *Pinus dalatensis* Ferré (Pinaceae) assessed by SSR markers. **Journal of Science and Technology**, v. 54, p. 178-189, 2016.

PLOMION C, CHAGNE D, POT D, KUMAR S, WILCOX PL, BURDON RD, PRATDG, PAIVA J, CHAUMEIL P, VENDRAMIN GG, SEBASTIANI F, NE SONCD, ECHT CS, SAVOLAINEN O, KUBISIAK TL, CERVERA MT, DE MAIAN, ISLAM-FARIDI MN. Pines. In: **Genome mapping an molecular breeding in plants**. Forest Trees. Springer, Berlin, v. 7, p 29–92, 2007.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2016. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>

SADAVA, D.; HELLER, C.; PURVES, W.K.; HILLIS, D.M. **Vida: A Ciência da Biologia** – 8ª edição. Evolução, Diversidade e Ecologia. Porto Alegre. Artmed, v. 2, 2009.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, v. 5 p. 63-69, 2004.

SHIMIZU, J. Y. **Pinus na Silvicultura Brasileira**. Colombo, PR: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Floresta, p.223, 2008.

SHINDE, D.; LAI, Y.; SUN, F.; ARNHEIM, N.; Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)<sub>n</sub>, and (A/T)<sub>n</sub> microsatellites, **Nucl. Acids Res.** v. 31, n. 3, p. 974–980, 2003.

SOUZA, H. G.; DORIA, K. M. A. B. V. S.; BASSETO, M. A.; ROSA, D. D.; FURTADO, E. L.; MARINO, C. L.; et al. Diversidade genética em populações-núcleo de *Eucalyptus grandis*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 4, 2010.

SUMMERS K.; AMOS W. Behavioral, ecological, and molecular genetic analyses of reproductive strategies in the Amazonian dart-poison frog, *Dendrobates ventrimaculatus*. **Behavioral Ecological**, v. 8, p. 260–267, 1997.

TANG, W.; OUYANG, F.; GUO, Z. Plant regeneration through organogenesis from callus induced from mature zygotic embryos of loblolly pine. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 557-560, 1998.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in diferente Eucaryotic Genomes: Survey and Analysis. **Genome Research**, v. 10, p. 967-981, 2000.

TURCHETTO, C.; TURCHETTO-ZOLET, A. C.; PASSAIA, G.; ZANELLA, C. M. Marcadores genéticos baseados em DNA. In: TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores moleculares na era Genômica: Metodologias e aplicações**. Sociedade Brasileira de Genética, p.181, 2017.

WAKELEY, P.C. **Planting the southern pines**. Washington, U.S. Dept. Agr. Monog. v. 18, p. 233, 1951.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **Society of Human Genetics**, v. 44, p. 388-396, 1989.

WEGRZYN, J. L.; LIECHTY, J. D.; STEVENS, K. A.; WU, L. S.; LOOPSTRA, C. A. VASQUEZ-GROSS, H. A.; DOUGHERTY, W.M.; LIN, B. Y.; ZIEVE, J. J.; MARTÍNEZ-GARCIA, P. J.; HOLT, C.; YANDELL, M.; ZIMIN, A. V.; YORKE, J. A.; CREPEAU, M. W.; PUIU, D.; SALZBERG, S. L.; , DEJONG, P. J.; MOCKAITIS, K.; MAIN, D.; LANGLEY, C. H.; NEALE, D. B. Unique Features of the Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) Megagenome Revealed Through Sequence Annotation. **Genética**, v.196, p.891-909, 2014.

WEINBERG, W. Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. Jahreshefte Verein f. vaterl. Naturk. In Wurtemberg, v. 64, p. 368-382, 1908.

WILLIAMS, J.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A., LABUDA, D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p.176-183, 1994.